

# РОЛЬ АЛЛЕЛЬНОГО ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ РЕЦЕПТОРОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА В ПЕРСИСТЕНЦИИ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА

О.П. Гумилевская<sup>1</sup>, Т.С. Киселева<sup>2</sup>, М.А. Риттер<sup>1</sup>, В.Н. Цыган<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Михайловская центральная районная больница, Михайловка, Волгоградская область, Россия

## The role of allelic polymorphism of receptor genes of innate immunity in the persistence of human papillomavirus

O.P. Gumilevskaya<sup>1</sup>, T.S. Kiseleva<sup>2</sup>, M.A. Ritter<sup>1</sup>, V.N. Tsygan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Military Medical Academy named after S.M. Kirov, Saint-Petersburg, Russia

<sup>2</sup>Mikhailovka Central District Hospital, Mikhailovka, Volgograd Region, Russia

### Резюме

Формирование устойчивой иммунорезистентности против вируса папилломы человека происходит во многом благодаря реакциям врожденной иммунной системы, опосредованным через Toll-like рецепторы. Аллельный полиморфизм генов Toll-like рецепторов, связанный с однонуклеотидными заменами, может влиять на чувствительность рецепции и приводить к нарушению распознавания патогенов и снижению восприимчивости организма к действию инфекционных агентов. Целью исследования стал поиск ассоциации полиморфизмов T-1237C, A2848G гена TLR 9, Phe-412 Leu гена TLR 3 и C-819 T, G-1082 A гена IL-10 с персистенцией вируса папилломы человека высокоонкогенного типа. В ходе работы было проведено обследование 194 женщин в возрасте 18–42 лет с наличием вируса папилломы человека 16 и 18 типов. Материалом для лабораторного исследования являлись соскоб со слизистой оболочки урогенитального тракта и периферическая кровь пациенток. В зависимости от присутствия вируса женщины были разделены на две группы: 98 пациенток с персистирующей папилломавирусной инфекцией и 96 женщин без вируса. При сравнении пациенток были выявлены значимые отличия в распределении вариантов полиморфных локусов (A2848G) TLR 9, (Phe412 Leu) TLR 3 и (G-1082A) IL-10.

**Ключевые слова:** вирус папилломы человека, полиморфизм, Toll-рецептор.

### Abstract

The development of a stable immunoresistance against human papillomavirus occurs largely due to the reactions of the innate immune system, mediated through Toll-like receptors. It is known, that allelic polymorphism of the Toll-like receptors genes, associated with single nucleotide polymorphisms can influence on the sensitivity of reception and lead to disruption of pathogen recognition and, thus lead to reduced susceptibility of the body to infectious agents. The aim of the study was to find the association of polymorphisms T-1237S, A2848G of TLR 9 gene, Phe-412 Leu of TLR 3 gene and C-819 T, G-1082 A of IL-10 gene with persistence of human papillomavirus infection of high oncogenic types. There were examined 194 women aged 18–42 years with the presence of HPV types 16 and 18. The material for laboratory studies were scraped from the mucosa of the urogenital tract and peripheral blood of patients. Depending on the presence of virus women were divided into two groups: 98 patients with persistent human papillomavirus infection and 96 women without it. As the result after investigation some significant differences in the distribution of variants of polymorphic loci (A2848G) TLR 9, (Phe412 Leu) TLR 3 and (G-1082A) IL-10 were identified.

**Key words:** human papillomavirus, polymorphism, Toll-like receptor.

### Введение

Согласно данным современной литературы, инициирующая роль в развитии цервикальной интраэпителиальной неоплазии принадлежит вирусу папилломы человека (ВПЧ) [1], который, длительно персистируя в многослойном эпителии, создает предпосылки для неогенеза. Следует отметить, что хроническая ВПЧ-инфекция после первичного заражения развивается не у всех инфицированных, и тому есть условия, обеспеченные индивидуальным генетическим фоном. Так, риск рака шей-

ки матки (РШМ) вдвое выше у родных сестер по сравнению со сводными сестрами или падчерицами. Учитывая тропность ВПЧ к многослойному плоскому эпителию, можно предположить, что в хронизации инфекции решающее значение имеет система местной защиты органов репродуктивного тракта [2]. С ответом на инфекцию и манифестацией заболевания может быть ассоциирован функциональный полиморфизм генов, кодирующих рецепторы врожденного иммунитета, которые играют ключевую роль в предрасположенно-

сти и тяжести инфекционного процесса [3]. Tool-like рецепторы (TLR) являются предметом активного изучения как в норме, так и при различных патологиях [4]. В последние годы ведутся работы по поиску ассоциаций аллельных полиморфизмов в генах TLR с патологическими состояниями на уровне слизистых оболочек, в том числе при заболеваниях урогенитального тракта [5]. С другой стороны, установлено, что для элиминации ВПЧ важен баланс между Т-хелпер1 и Т-хелпер2 путями иммунного ответа [6], на который может влиять способность ВПЧ усиливать продукцию иммуносупрессорного IL-10 [7, 8].

**Цель исследования** — поиск ассоциации полиморфизмов T-1237C, A2848G гена TLR 9, Phe-412 Leu гена TLR 3 и C-819 T, G-1082 A гена IL-10 с персистенцией ВПЧ в эпителии шейки матки.

### Задачи исследования

1. Охарактеризовать распределение полиморфизмов T-1237C, A2848G TLR 9, Phe-412 Leu TLR 3 и C-819 T, G-1082 A гена IL-10 у женщин с персистирующей формой папилломавирусной инфекции высокого онкогенного типа Волгоградской области.

2. Оценить связь полиморфных вариантов T-1237C, A2848G TLR 9, Phe-412 Leu TLR 3 и C-819T, G-1082A гена IL-10 с персистенцией ВПЧ 16, 18 типов.

### Материалы и методы

В ходе работы было проведено обследование 194 женщин в возрасте 18–42 лет ( $30,57 \pm 1,81$ ), из анамнеза которых известно наличие ВПЧ ВОТ. Материалом для лабораторного исследования являлись соскоб со слизистой оболочки урогенитального тракта и периферическая кровь пациенток, взятая утром натощак, в пробирки с антикоагулянтом 3% ЭДТА. Все обследуемые наблюдались на протяжении не менее трех лет. Всем пациентам определяли наличие ДНК ВПЧ 16 и 18 типов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) по конечной точке (наборы реагентов «АмплиСенс ВПЧ 16/18-FL», производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, ООО «ИнтерЛабСервис», Москва). В зависимости от присутствия вируса женщины были разделены на две группы: 98 пациенток с персистирующей папилломавирусной инфекцией (первая группа ВПЧ+) и 96 женщин без ВПЧ (вторая группа ВПЧ-).

Для исследования точечных нуклеотидных полиморфизмов (SNP) генов TLR и IL-10 использовались образцы ДНК, выделенной из лейкоцитов крови. Идентификация полиморфных аллелей генов осуществлялась методом аллельспецифической полимеразной цепной реакции с последую-

щей электрофоретической детекцией в агарозном геле. На всех стадиях проведения молекулярно-генетических исследований использовались реактивы и методики, разработанные ООО НПФ «Литех» (г. Москва).

### Результаты и обсуждение

Необходимо отметить, что в научной литературе имеются многочисленные и в то же время противоречивые данные о роли TLR 9 и его полиморфизмов в развитии РШМ при ВПЧ. В ряде исследований установлено, что у пациенток с персистирующей ПВИ не выявлялись клетки, продуцирующие TLR 9. Другие исследования показали активную экспрессию TLR 9 раковыми клетками. Существует достаточно работ, посвященных оценке роли полиморфных вариантов гена TLR 9, в реализации риска РШМ при ВПЧ [9, 10]. Таким образом, можно предположить, что конкретные SNP TLR 9 могут влиять и на клиренс вируса.

Результаты исследования распределения аллелей локуса A2848G TLR 9 позволили установить, что у пациенток с персистенцией ВПЧ частота встречаемости гомозиготы AA была 23%, что значительно больше, чем в группе женщин без ВПЧ (12%). В то же время гетерозиготный фенотип AG у пациенток с персистирующей папилломавирусной инфекцией встречался реже, чем у женщин без ВПЧ (35% и 53% соответственно). При сравнении пациенток с персистирующей папилломавирусной инфекцией и женщин без ВПЧ не было выявлено значимых отличий в распределении вариантов еще одного исследованного аллельного полиморфизма TLR 9, T-1237C.

TLR3 является одним из основных медиаторов противовирусного иммунного ответа, поскольку распознает вирусную РНК в цитоплазме зараженных клеток. Однако данные относительно роли TLR 3 и персистенции ПВИ и ее исходов не однозначны. Так, одни исследователи обнаружили связь между клиренсом ВПЧ и уровнем экспрессии TLR 3 [10], другие установили, что повышенный уровень TLR 3 может быть маркером уже диспластических изменений эпителия [11].

Анализ частот встречаемости аллельных вариантов полиморфного локуса Phe412 Leu гена TLR 3 позволил установить значительно меньшую частоту встречаемости гомозиготного генотипа Phe/Phe у пациенток с персистенцией ВПЧ по сравнению с группой женщин без ВПЧ (4% против 13%). В то же время гомозиготный фенотип Leu/Leu у пациенток с персистирующей папилломавирусной инфекцией встречался чаще, чем у женщин без ВПЧ (56% и 38% соответственно).

При сравнении пациенток с персистирующей папилломавирусной инфекцией и женщин без ВПЧ не было выявлено значимых отличий рас-

пределения аллельных вариантов полиморфизма C-819T гена IL-10. В то же время исследование аллельной вариации локуса G-1082A гена IL-10 позволило установить, что у пациенток с персистенцией ВПЧ частота встречаемости гетерозиготы GA была 51%, что значимо больше, чем в группе женщин без ВПЧ (37%). Данные литературы относительно полиморфизма гена (G-1082A) IL-10 и риска развития РШМ разноречивы. Согласно G.A. Stanczuk et al. существует значимая связь полиморфизма G1082A гена IL-10 с РШМ [12], в то время как M. Zoodsma et al., сообщают об отсутствии такой связи [13]. Таким образом, учитывая тот факт, что генотип AA ассоциирован с низким синтезом IL-10, а генотипы GA и GG связаны с умеренной и высокой продукцией соответственно, можно ожидать снижения иммунологической защиты на локальном уровне при наличии мутации в гене IL-10 в результате повышения его концентрации в цервикальной слизи, и как следствие — повышение частоты развития неоплазий шейки матки.

### Заключение

Полученные данные позволяют заключить, что особенности рецепции toll-like рецепторами играют важную роль в персистенции вируса ВПЧ и наличие определенных аллельных вариантов полиморфных маркеров A2848G гена TLR 9, Phe-412Leu гена TLR 3 может предрасполагать к неэффективности клиринга от инфекта. Кроме того, уровень синтеза иммуносупрессорного цитокина IL-10, определяемого полиморфизмом G-1082A гена IL-10 также способен оказать значимое влияние на эффективность иммунного ответа при инфекции ВПЧ. Выявленные ассоциации необходимо учитывать в прогностической диагностике ВПЧ-инфекции.

### Литература

1. Абрамовских, О.С. Иммунологические аспекты патогенеза папилломавирусной инфекции репродуктивного тракта женщин / О.С. Абрамовских [и др.] // Иммунопатология, аллергология, инфектология. — 2012. — № 2. — С. 95—101.
2. Нестеров, И.М. Иммунокорригирующая терапия инфекционно-воспалительных заболеваний женской половой сферы: практическое пособие для практикующих врачей акушеров-гинекологов, студентов медицинских вузов, врачей-интернов и клинических ординаторов / И.М. Нестеров, А.А. Тотолян, Э.К. Айламазян. — СПб.: Тактик-Студио, 2007. — 56 с.
3. Иванов, А.М. Полиморфизм рецепторов врожденного иммунитета / А.М. Иванов [и др.] // Вестник Российской военно-медицинской академии. — 2009. — Т. 1, № 25. — С. 172—184.
4. Бережная, Н.М. Toll-like рецепторы и онкогенез / Н.М. Бережная // Онкология. — 2013. — Т. 15, № 2. — С. 76—87.
5. Лемякина, Е.В. Особенности snp полиморфизма генов Toll рецепторов при хроническом неспецифическом

цервиците / Е.В. Лемякина, Б.Ю. Гумилевский // Врач-аспирант. — 2013. — Т. 61, № 6.3. — С. 427—431.

6. Долгушин, И.И. Содержание цитокинов в цервикальной слизи женщин с хроническим цервицитом, ассоциированным с папилломавирусной инфекцией, в зависимости от вирусной нагрузки / И.И. Долгушин [и др.] // Цитокины и воспаление. — 2010. — Т. 9, № 4. — С. 20—22.

7. Курмышкина, О.В. Иммунный ответ организма при индукции и прогрессии рака шейки матки — возможные механизмы / О.В. Курмышкина [и др.] // Гинекология. — 2011. — № 3. — С. 65—70.

8. Ризванова, Ф.Ф. Генетическая диагностика: полиморфизм генов цитокинов / Ф.Ф. Ризванова [и др.] // Практическая медицина. — 2010. — Т. 6, № 45. — С. 41—43.

9. Chen X, Wang S, Liu L et al. A genetic variant in the promoter region of Toll-like receptor 9 and cervical cancer susceptibility. *DNA Cell Biol.* 2012 May;31(5):766-71.

10. Daud II, Scott ME, Ma Y. Association between toll-like receptor expression and human papillomavirus type 16 persistence. *International Journal of Cancer.* 2011; 128:879—86.

11. DeCarlo CA, Rosa B, Jackson R et al. Toll-Like Receptor Transcriptome in the HPV-Positive Cervical Cancer Micro-environment. *Clinical and Developmental Immunology.* 2012; 2012:1-9.

12. Stanczuk GA, Sibanda EN, Perrey Ch et al. Cancer of the uterine cervix may be significantly associated with a gene polymorphism coding for increased IL-10 production. *International Journal of Cancer.* 2001 Sep;94(6):792—94.

13. Zoodsma M, Nolte IM, Schipper M et al. Interleukin-10 and Fas polymorphisms and susceptibility for (pre) neoplastic cervical disease. *Int. J. Gynecol. Cancer.* 2005;15(3):282—90.

### References

1. Abramovskikh O.S., Telesheva L.F., Letyaeva O.I. et al. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya.* 2012; 2: 95-101 (in Russian).
2. Nesterov I.M., Totoljan A.A., Ajlamazjan Je.K. *Immunotherapy of infectious and inflammatory diseases of the female reproductive organs: a practical guide for practitioners obstetricians, medical students, medical interns and medical residents.* SPb.: Taktik-Studio; 2007 (in Russian).
3. Ivanov A.M., Apchel A.V., Kamilova T.A. et al. *Vestnik Rossiyskoy voenno- medicinskoj akademii.* 2009; 1(25): 172-84 (in Russian).
4. Berezhnaya N.M. *Onkologiya.* 2013; 15(2): 76-87 (in Russian).
5. Lemjakina E.V., Gumilevskij B.Ju. *Vrach-aspirant.* 2013; 61(6.3): 427-31 (in Russian).
6. Dolgushin I. I., Dolgushina V.F., Telesheva L.F. et al. *Citokiny i vospalenie.* 2010; 4 (9): 20-2 (in Russian).
7. Kurmyshkina O.V., Volkova T.O., Kovchur P.I. et al. *Ginekologiya.* 2011; № 3: 65-70 (in Russian).
8. Rizvanova F.F., Pikuza O.I., Fayzullina R.A. et al. *Prakticheskaya medicina.* 2010; 6(45): 41-3 (in Russian)
9. Chen X, Wang S, Liu L et al. A genetic variant in the promoter region of Toll-like receptor 9 and cervical cancer susceptibility. *DNA Cell Biol.* 2012 May;31(5):766-71.
10. Daud II, Scott ME, Ma Y. Association between toll-like receptor expression and human papillomavirus type 16 persistence. *International Journal of Cancer.* 2011; 128:879—86.
11. DeCarlo CA, Rosa B, Jackson R et al. Toll-Like Receptor Transcriptome in the HPV-Positive Cervical Cancer Micro-environment. *Clinical and Developmental Immunology.* 2012; 2012:1-9.
12. Stanczuk GA, Sibanda EN, Perrey Ch et al. Cancer of the uterine cervix may be significantly associated with a gene poly-

morphism coding for increased IL-10 production. International Journal of Cancer. 2001 Sep;94(6):792 – 94.

13. Zoodsma M, Nolte IM, Schipper M et al. Interleukin-10 and Fas polymorphisms and susceptibility for (pre) neoplastic cervical disease. Int. J. Gynecol. Cancer. 2005;15(3):282 – 90.

---

*Авторский коллектив:*

*Гумилевская Оксана Петровна* — начальник центра клинической лабораторной диагностики Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, д.м.н., наук, доцент; тел.: +7-905-225-03-30, e-mail: ogum@mail.ru

*Киселева Татьяна Сергеевна* — врач клинической лабораторной диагностики клинико-диагностической лаборатории Консультативно-диагностического центра Михайловской центральной районной больницы; тел.: +7-906-171-42-74, e-mail: sveklashka@rambler.ru

*Риттер Мария Александровна* — заведующая лабораторией контроля качества центра клинической лабораторной диагностики Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова; тел.: +7-999-214-10-46; e-mail: ritterm@rambler.ru

*Цыган Василий Николаевич* — заведующий кафедрой патологической физиологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, д.м.н., профессор; тел.: +7-965-003-97-15